

THESIS

Münster

1968

**Experimentelle Untersuchungen über
den Einfluß von Albumin, Globulin
und Avidin-Biotin auf die
Cholesterinsynthese in Vitro**

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305

HENRIK v. DEHN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154017_0003

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS
VON ALBUMIN, GLOBULIN UND AVIDIN-BIOTIN AUF DIE
CHOLESTERINSYNTHESE IN VITRO

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt

von

Henrik v. Dehn

aus

Reval / Estland

München 1968

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. F. Marguth

Tag der mündlichen Prüfung: 3. 12. 1968

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS
VON ALBUMIN, GLOBULIN UND AVIDIN-BIOTIN AUF DIE
CHOLESTERINSYNTHESE IN VITRO

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	
1. Die Cholesterinsynthese	1
2. Die Bedeutung des Cholesterins	7
3. Problemstellung	10
II. Experimenteller Teil	12
1. Isolierung des Enzymsystems	12
2. Inkubation	13
3. Darstellung des synthetisierten C ¹⁴ Cholesterins	13
4. Bestimmung der Radioaktivität des Cholesterins	14
III. Ergebnisse	16
IV. Diskussion	23
V. Zusammenfassung	27
VI. Literaturverzeichnis	29

Die Cholesterinsynthese

Die Synthese des Cholesterin gewann eine Bedeutung, als Ruzicka die Hypothese aufstellte, daß das Cholesterin und die Steroide zu einer großen Klasse von Naturstoffen gehören, die aus einer gemeinsamen Vorstufe mit dem Bauelement Isopren entstehen.

Seine Isoprenregel besagt, daß all diesen Verbindungen das Kohlenstoffgerüst $\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}$ zugrunde liegt (1). 1937 fanden Sonderhoff und Thomas (2), daß bei der Biosynthese der Steroide die Essigsäure Verwendung finden muß. Sie konnten nachweisen, daß Acetat, das an der Methylgruppe mit Deuterium markiert worden war, in die Steroidfraktion eingebaut wurde. Später wurde von Bloch gezeigt, daß alle Kohlenstoffatome des Cholesterins von der Essigsäure stammen. Als Zwischenprodukt der Synthesekette wurde 1926 von Heilbron, Kamm und Owens (3) das Squalen aufgefunden. Dabei wurde die Struktur im wesentlichen aufgeklärt und ein Zusammenhang mit den Steroiden erkannt. Daß Squalen wirklich eine Zwischenstufe der Cholesterinbiosynthese ist, konnte Cannon (4, 5) zeigen, als er Squalen, das aus Haifischlebern gewonnen wurde (6), an Kaninchen verfütterte. Bei den Kaninchen zeigte sich ein erhöhter Cholesteringehalt in der Leber. Erst Langdon und Bloch konnten den Beweis für diese Erkenntnis liefern (7, 8). Sie verfütterten radioaktiv markiertes Acetat zusammen mit normalem Squalen an Ratten. Aus den Rattenlebern konnte radioaktives Squalen gewonnen werden, das an Mäuse verfüttert wurde. Aus den Mäusen konnte radioaktives Cholesterin isoliert werden.

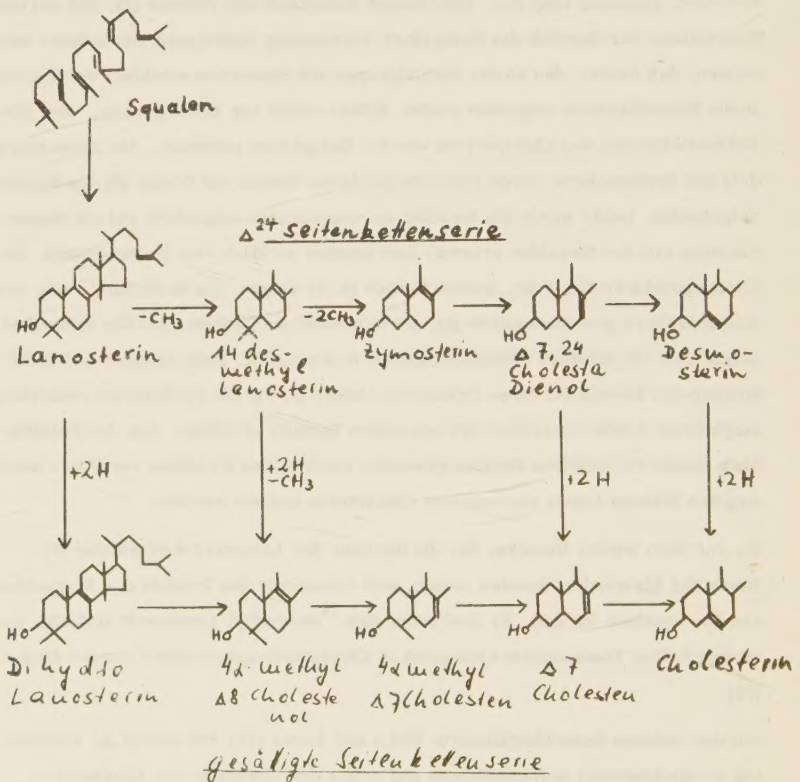
Es war dann wieder Ruzicka, der die Struktur des Lanosterins ermittelte (9). Bloch und Mitarbeiter konnten zeigen, daß Lanosterin das Produkt des Ringschlusses des Squalens ist (10). Er fand auch, daß ^{14}C -desmethyl Lanosterin (11) und Zymosterin über Desmosterin biologisch in Cholesterin umgewandelt werden können (12).

Auf der anderen Seite identifizierte Wells und Lorah (13) 4α -methyl Δ^7 cholestenol (= Methostenol) in Rattenlebern und zeigte den Übergang zum Cholesterin.

Steinberg und Avigan (14, 15) zeigten zwei Wege des Intermediärstoffwechsels: Eine " Δ^{24} Serie" mit einer Doppelbindung an C^{24} und dem Endprodukt Desmosterin

und eine zweite "gesättigte Seitenkettenserie". An welcher Stelle die Seitenkettenreduktion normalerweise vorsich geht, ist nicht bekannt.

Zum besseren Verständnis seien die beiden Wege kurz skizziert:



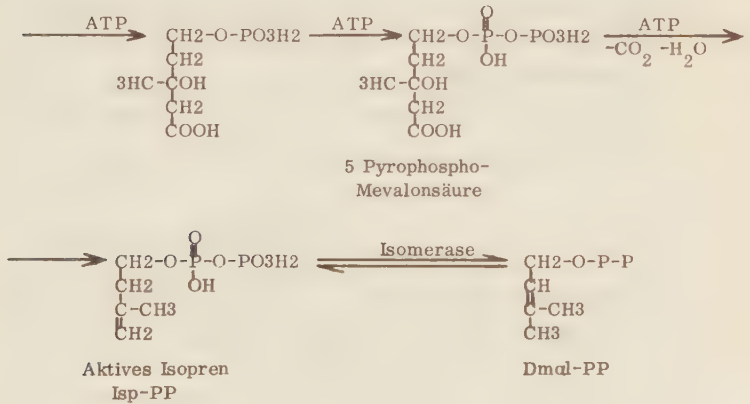
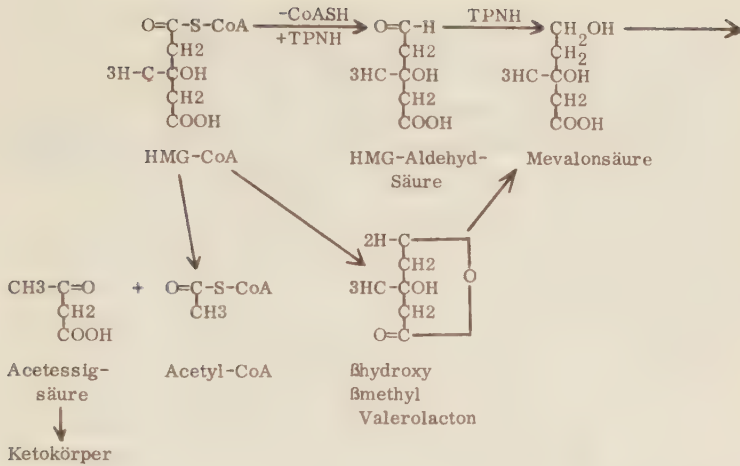
Die verschiedenen Schritte der Synthese

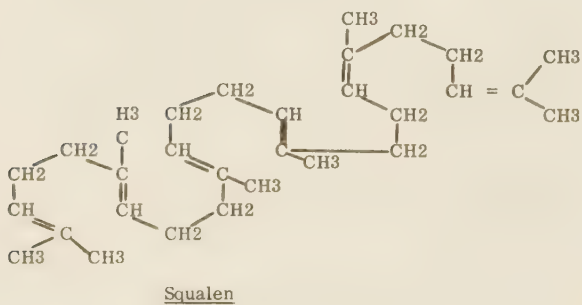
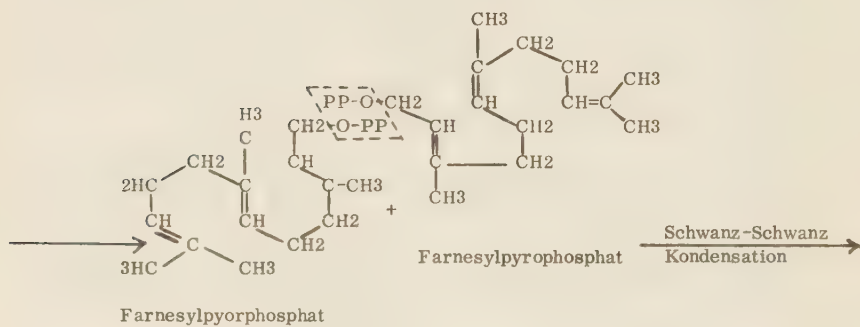
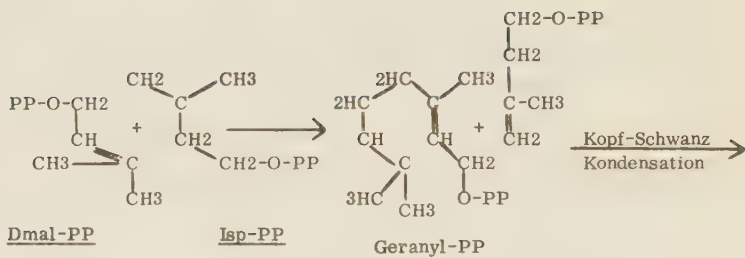
Für die Erkenntnis, daß die Mevalonsäure aus Essigsäure entsteht, war die Entdeckung und Strukturermittlung des Coenzym A (Lipmann, Novelli) (2) Voraussetzung. Die zweite wichtige Entdeckung war die Identifizierung der aktiven Essigsäure mit dem Thioester aus Essigsäure und CoA. Die Aktivierung des Acetats und die Kondensation von zwei Molekeln Acetyl CoA zum Aceto-Acetyl CoA konnte Lynen 1952 aufklären. 1957 konnte er nachweisen, daß die Kondensation von Aceto-Acetyl CoA mit Acetyl CoA das β -hydroxy- β -methyl glutaryl CoA (HMG-CoA) ergibt (16, 17).

Das HMG-CoA wurde als die wichtigste Zwischenstufe der Cholesterinbiosynthese erkannt. Daraus werden in der Leber die Ketokörper (Acetessigsäure) gebildet. HMG-CoA kann aus Leucin gebildet werden. Diese Aminosäure kann folglich auch ein Ausgangsprodukt der Cholesterinsynthese sein. Diese Tatsache konnte von Bloch schon vor der Entdeckung der HMG-Säure gezeigt werden.

Etwa zur gleichen Zeit wurde von Folkers die β -dihydroxy- β -methyl-Valeriansäure (Mevalonsäure) entdeckt (19). Tavormina konnte anhand von Versuchen nachweisen, daß die Mevalonsäure, die strukturverwandt mit der HMG-Säure ist, eine Schlüsselsubstanz der Isoprenoidsynthese darstellt (20). Lynen konnte den Reaktionsweg von dem HMG-CoA zur Mevalonsäure aufklären (21): Die CoA-Gruppe wird reduzierend abgespalten, aus der Carboxylgruppe wird unter Verbrauch von 2 Triphosphopyrimidin-Nucleotid (TPNH + H) eine Alkoholgruppe. Als Zwischenprodukt kommt die β -hydroxy- β -methyl-Aldehydsäure (HMG-Aldehydsäure) oder das sehr aktive β -hydroxy- β -methyl-Valerolacton infrage (22).

Bei der weiteren Synthese wird die Mevalonsäure zunächst phosphoryliert, wobei in 2 Stufen unter Verbrauch von jeweils 1 Adenosintriphosphat (ATP) das energiereiche Pyrophosphat entsteht. Unter Abspaltung von CO_2 und H_2O entsteht bei erneutem ATP-Verbrauch ein Zwischenprodukt, das Lynen als 3methyl - 3butenyl-1Pyrophosphat identifizieren konnte (23). Diese Verbindung wurde als das aktive Isopren erkannt. Es geht nach Isomerisierung zum Dimethyl-allyl-Pyrophosphat (DmalPP) eine Kettenreaktion ein: Unter Freisetzung von Phosphat reagiert das pyrophosphattragende Ende (Schwanz) des DmalPP mit der Methylgruppe (Kopf) des





Bedeutung des Cholesterins

Cholesterin ist ein Stoff, der vom Körper synthetisiert wird. Es ist ein Intermediärprodukt in der Synthese der Gallensäuren und der Steroidhormone.

Cholesterin steht in enger Beziehung zu den Phosphatiden und Fettsäuren. In Tierversuchen ergab sich, daß bei Verfütterung von reinem Cholesterin neben einem Cholesterinanstieg im Serum auch ein Anstieg von Phosphatiden und Triglyceriden zu beobachten war. Der Triglyceridanstieg entsprach in den meisten Fällen relativ und absolut dem des Cholesterins (33). Der Cholesterinstoffwechsel ist vom Gesamtmetabolismus abhängig. Acetyl-CoA ist die wichtigste Coenzym A Verbindung und nimmt eine zentrale Stellung im Stoffwechsel ein: Aminosäuren, Kohlenhydrate, Fettsäuren, Zitronensäurecyclus. Cholesterin kommt verestert und in freier Form in allen tierischen Zellen, besonders im Nervengewebe und im Blut vor. Ein erhöhter Cholesterinspiegel hat Einfluß auf die Atherosklerose (Angina Pectoris, Myokardinfarkt, Cerebrale Insulte) und wird oft bei Hypertonie, Adipositas, Diabetes mellitus, Nephrosen, biliären Cirrhosen, bei Myxödem, Psoriasis (25) und bei Xanthomatosen gefunden.

Um bei den vorgenannten Erkrankungen eine Normalisierung der Lipidwerte zu erzielen, ist es wichtig, zunächst die Grundkrankheit zu behandeln. Dabei ist die Ausschaltung der der Hyperlipämie zugrunde liegenden exogenen oder endogenen Faktoren erstrebenswert (Diabetes-Insulin, Nephrosen-Kortikoide usw.).

Um eine Serumlipidsenkung zu erreichen, wurden medikamentöse und diätetische Maßnahmen empfohlen.

Sie lassen sich in folgende Gruppen gliedern:

1. Natürlich vorkommende Lipide mit hohem Gehalt an Polyensäurehaltigen Phospholipiden. Das sind Phosphatide mit hohem Gehalt an Linol- und Arachidonsäure.

Mit diesen Präparaten gelingt eine ausreichende Serumlipidsenkung nur, wenn sie in sehr hohen Tagesdosen verabreicht werden. Sie sind nur auf oralem Wege applizierbar. Injektionspräparate enthalten zu geringe Mengen Wirkstoff. Sie bewirken nur eine für wenige Stunden anhaltende Abnahme der Serumlipide.

Der lipidsenkende Effekt wird durch eine bessere Klärfähigkeit des Blutes erreicht (34).

2. Vitamin-Kombinationspräparate (bes. A und E):

Diese Mittel haben keinen deutlichen Erfolg gezeigt.

3. Hormone und Hormonanaloge:

Dabei wirken Oestrogene, Androsteron und Schilddrüsenhormone stark lipidsenkend.

Wegen der sehr unerwünschten Nebenwirkung ist aber der Verordnung dieser Medikamente meist ein Riegel vorgeschoben. Es gelang eine Substanz zu entwickeln, die der Horeau-Säure nahesteht und ein abgeändertes Oestrogen darstellt. (CPIB) Diese Substanz hat eine geringe Toxizität (35). Der Wirkungsmechanismus ist dabei im wesentlichen unaufgeklärt, es konnte nur festgestellt werden, daß keine Desmosterolanhäufung erfolgte. Das wäre der Fall, wenn die Cholesterinsynthese nach diesem Syntheseprodukt gehemmt würde (36). Es wird eine indirekte Wirkung auf Blutlipide angenommen, die auf die hohe Affinität zu Plasmaalbuminen zurückgeführt wird.

4. Heparin oder Heparinoide:

Diese Gruppe von Präparaten findet bei thromb-embolischen Prozessen Anwendung. Diese Substanzen eignen sich aber wegen der Notwendigkeit der parenteralen Zufuhr nicht zu einer sehr lange dauernden Therapie. Oral verabreichte Präparate senken die Serumlipidkonzentration nicht zuverlässig. Der Wirkungsmechanismus entspricht dem der polyensäurehaltigen Phosphatide (37).

5. Synthetische Verbindungen, deren lipidsenkende Wirkung empirisch erkannt wurde:

Die Nikotinsäure bewirkt eine starke Senkung erhöhter Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen. Dabei sind Tagesdosen von 2,0 g wirksam (38). Der Hemmungsmechanismus ist auch hier ungeklärt. Neben Gallensäuren, Phenyläthyllessigsäure (39) haben auch noch andere Stoffe Einfluß auf die Cholesterinkonzentration im Serum.

Die meisten Präparate erwiesen sich aber beim Menschen als toxisch, hatten

nicht die erhoffte Wirkung oder blockierten die Synthese auf einer unerwünschten Stufe. Diese Stufen sind im wesentlichen:

Essigsäure - Mevalonsäure - Squalen - Desmosterol - Cholesterin.

Eine sinnvolle Blockierung wäre die zwischen Mevalonsäure und Squalen, da die Mevalonsäure für wichtige Stoffwechselvorgänge vonnöten ist (Vitamin E, K). Ein späterer Block würde cholesterinähnliche Stoffe im Körper anreichern, die den oben genannten Krankheiten Vorschub leisten könnten. Während das unter 4. genannten CPIB (Regelan^(R)) keine Desmosterolanhäufung verursacht, hemmt das Triparanol (MER 29) die Cholesterinsynthese zwischen Desmosterol und Cholesterin, sodaß eine sinnvolle Blockierung für therapeutische Zwecke nicht gewährleistet erscheint.

6. Diätetische Maßnahmen:

Die Cholesterinsynthese wird durch ein Überwiegen gesättigter Fette in der Nahrung stimuliert. Auf der Erfahrung basierend, daß ungesättigte Fettsäuren die Cholesterinsynthese hemmen, ging das Bestreben dahin, eine Diät zusammenzustellen, bei der gesättigte Fettsäuren gegen ungesättigte ausgetauscht sind (31). Dabei wurde eine Kostform vorgeschlagen, die nicht mehr als 30 % Fettkalorien enthält und in der mindestens ein Drittel der darin enthaltenen Fettsäuren Polyensäuren sind. Der Nutzen einer solchen Diätbehandlung bei Atherosklerose ist fragwürdig geworden, seit man weiß, daß es gerade die hochgesättigten Fettsäuren sind, die in den Atheromatoseherden angereichert werden. Auch war bei dieser Diät innerhalb 5 Wochen nur bei etwa 50 % der Patienten eine Cholesterinsenkung zu beobachten (33).

Ein Absinken der vier-, sechs- und mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Blut kann experimentell nur durch eine extrem fettarme Diät erzeugt werden (Keys). Das führt aber zur Bildung von physiologisch minderwertigen 3- und 5-fach ungesättigten Fettsäuren aus Kohlenhydraten.

Bis heute ist es nicht gelungen, eine zuverlässige Senkung des Cholesterinspiegels im Blut zu erreichen.

Da der Hauptanteil des endogen gebildeten Cholesterins in der Leber entsteht,

erscheint uns eine Hemmung der Cholesterinsynthese in diesem Organ von vor-
dringlicher Bedeutung.

Problemstellung

Alle Infektionskrankheiten, auch banale, interkurrente Infekte gehen mit einer Lipidsenkung einher. Durch diese Krankheiten werden auch andere Stoffwechselvorgänge beeinflusst. Man beobachtet zum Beispiel in den Serumproteinfraktionen eine Erhöhung der alpha- und beta-Globuline. Ob diese Globuline im Sinne einer Selbstregulation die Cholesterinsynthese beeinflussen, soll in dieser Arbeit geprüft werden.

Als Testsubstanz wurde u. a. auch Mischserum gesunder Menschen eingesetzt. Dabei soll gezeigt werden, daß darin Stoffe enthalten sind, die Einfluß auf die Cholesterinsynthese nehmen können.

Daß die Cholesterinsynthese einer Selbstregulation unterliegt, konnte Sieperstein (40) zeigen. Bei einer Cholesterinreichen Kost wurde viel weniger C^{14} markiertes Acetat in das Cholesterin eingebaut, als bei einer Cholesterinarmen Kost. Markierte Mevalonsäure und Squalen wurden hingegen in etwa gleichem Maße zum Cholesterin synthetisiert.

Die Cholesterinsynthese wird dabei zwischen HMG-CoA und Mevalonsäure blockiert: Das HMG-CoA wird für die Ketogenese und Acetyl-CoA für die Fettsäuren und andere Synthesen benötigt. Eine Stoffwechselverschiebung bei diesen Syntheseprodukten konnte nicht ermittelt werden.

Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin, das aus Leberextrakten (Du Vigneaud) und als Hefewachstumsfaktor (Bios-Faktor) aus Eigelb (Kögl) isoliert wurde (41).

Die aktive Form des CO_2 ist die an das Biotin gebundene, wobei die Beladung des Biotins mit CO_2 eine endergonische Reaktion ist. Lynen und seine Mitarbeiter konnten nachweisen, daß aktives CO_2 bei zahlreichen Carboxylierungsvorgängen eingreift. Biotin wird in der Darmflora im Übermaß produziert (42). Es wird in den Fäces und im Urin ausgeschieden (43). Bei Vitamin H- (Biotin) Mangel zeigten sich Hauterkrankungen (Dermatitis) und multiple nervöse Störungen. Im Blut tritt ein

Erythrocyten- und Hämoglobinabfall auf.

Biotinmangel kann durch Avidingaben hervorgerufen werden. Avidin wurde aus Eiklar isoliert und ist ein Protamin mit einem Molekulargewicht von ca. 70 000. Avidin verbindet sich amidartig mit der Carboxylgruppe des Biotin. Es kommt zu einem unlöslichen Komplex (Avidin-Biotin-Komplex), der im Darm nicht proteolytisch gespalten werden kann (44).

In dieser Arbeit soll gezeigt werden, inwieweit die Cholesterinsynthese durch Biotin, Avidin und den Avidin-Biotin-Komplex beeinflusst wird.

Experimenteller Teil

Für die Ausführung unserer Versuche lagen uns Angaben von Brady und Gurin vor, die wir nur veränderten, indem wir ein Enzymsystem aus Tauben- statt Rattenlebern benutzten (45). Dabei lag die Erkenntnis zugrunde, daß dieses Enzymsystem eine etwa 10 % höhere Ausbeute an markiertem Cholesterin erbringt, als die Enzymsysteme aus Rattenlebern. Um keine allzugroßen Schwankungen in der Cholesterinausbeute hinnehmen zu müssen, verwandten wir etwa gleichaltrige, gesunde, junge, gutgenährte Tauben, die vorher ausschließlich mit Weizenkörnern gefüttert wurden. V. Brand und Helmreich zeigten nämlich, daß bei Tauben, die 72 Stunden hungerten, eine stark verringerte Fett- und Cholesterinsynthese stattfand (46).

Isolierung des Enzymsystems:

Um mehrere Versuche mit einer Enzympräparation durchführen zu können, verwandten wir Lebern von 3 - 5 Tauben, die sofort nach Dekapitation der Tauben herauspräpariert und zum Schutz der Fermente in destilliertes Eiswasser gelegt wurden. Die Lebern wurden dann sorgfältig von Bindegewebe und anderen anhaftenden Gewebspartikeln befreit, da diese die Synthesefähigkeit stark herabsetzen. Die Lebern wurden auf Filterpapier getrocknet, zerkleinert und gewogen. Für unsere Versuche war ein Gewicht von 30 Gramm am günstigsten.

Um daraus ein Enzymsystem zu isolieren, wurde das 1,2 Fache des Gewichtes an Puffer zugesetzt (0,085 m K_2HPO_4 , 0,009 m K_2PO_4 , 0,07 m $KHCO_3$ zu gleichen Teilen, pH: 7,4) (46) und in einem Handhomogenisator nach Potter-Elvehjem homogenisiert. Dabei wurden die Zellwände weitgehend zerstört. Ein Gramm Leber entsprach 0,8 ml des so gewonnenen Homogenates, das 45 Minuten lang im Eisschrank bei einer Umdrehungszahl von 2000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde solange mit derselben Pufferlösung versetzt, bis 4 ml 3 Gramm Leber entsprachen. Der Bodensatz wurde verworfen. Ein erneutes, 75 Minuten langes Zentrifugieren bei 25 000 Umdrehungen ergab einen zellfreien Überstand (Supernatand fluid = sup), der für die Versuchsreihen Verwendung fand. Dieser Überstand ist frei von Zellbestandteilen, enthält aber noch Mikrosomen

und Mitochondrien (45), die erst mit einer Ultrazentrifuge von 100 000 Umdrehungen pro Minute abgeschleudert werden. Diese Zentrifuge stand uns nicht zur Verfügung.

Inkubation:

Die Synthese des Cholesterins und der Fettsäuren aus aktivem Acetat vollzog sich im Inkubator nach Warburg. 11 Kölbchen des Warburg-Apparates wurden mit 2,3 ml unseres Enzymsystems gefüllt. Dazu wurde, um eine maximale Ausbeute an neugebildetem Cholesterin zu erreichen

0,1 ml Magnesiumchlorid, 0,06 m Endkonzentration (Fermentaktivator)

0,1 ml Natriumcitrat, 0,01 m Endkonzentration (Für den Einbau von $1\text{-C}^{14}\text{Na-Acetat}$ unumgänglich) und

0,4 ml Aktives Acetat, 0,008 m Endkonzentration hinzugegeben.

Dann wurden noch 0,1 ml der zu prüfenden Substanz, H_2O oder Puffer einpipetiert. Die Versuche liefen bei einem pH von 7,2 - 7,4 ab.

Die Kölbchen wurden verschlossen und unter ständigem Schütteln 3 Stunden im Warburg-Apparat bei 38 Grad C. bebrütet.

Präparation des synthetisierten C^{14} -Cholesterins:

Wir folgten wiederum den Angaben von Brady und Gurin. Zunächst wurde der Inhalt eines Warburg-Kölbchens mit 7 ml aqua bidest. und 5 ml 30prozentiger alkoholischer KOH unter Zusatz von 25 mg Palmitinsäure bei ständigem Rückfluß des verdampften H_2O bei Siedetemperatur in einem 50 ml-Schliffkölbchen verseift. Der abgekühlte Ansatz wurde zusammen mit 20 ml Petroläther in einen Scheidetrichter gefüllt. Nach Zugabe von 5 Tropfen Bromkresyl-Methylorange als Indikator wurde solange 18prozentige HCl hinzutitriert, bis der Farbumschlag von grün nach rot eine leichte Ansäuerung anzeigte. Es bildete sich eine deutliche, klare Petrolätherphase, in der die synthetisierten Fettsäuren und das Cholesterin gelöst waren. Der Petrolätherauszug wurde in ein 50 ml Becherglas gefüllt. Das Verseifungsgemisch wurde 4 mal mit Petroläther durchgeschüttelt, um sämtliche neugebildeten Fettsäu-

ren und alles Cholesterin zu erfassen. Die Auszüge wurden im Wasserbad langsam eingedampft. Die Rückstände wurden mit genau 10 ml Petroläther gelöst und enthielten die aus dem aktiven Acetat neugebildeten Fettsäuren und Cholesterin. Um nun das markierte Cholesterin zu bestimmen, wurden davon 4 ml entnommen (die übrigen 6 ml dienten zur Bestimmung der Fettsäuren) und in Reagenzgläsern bis zur Trockne eingedampft. Mit 4 ml Bloor'scher Lösung (3 Teile 96 % Alkohol, 1 Teil Äther) wurde der Rückstand gelöst. Dann wurde mit 3 Tropfen 2n KOH bei einem Zusatz von 2 Tropfen Phenolphthalein alkalisiert und eine Stunde bei 37°C. verseift. Durch Zusatz von 1 ml einprozentiger alkoholischer Digitoninlösung bildete sich unlösliches Cholesterindigitonid. Nach Stehenlassen über Nacht wurde die Fällung mit einem Filtriergerät⁺ auf Filterpapier⁺⁺ gebracht. Um alle Reste von Fett und anderen unspezifischen Substanzen zu entfernen, wurde mit einem 1/1 Aceton-Äther-Gemisch nachgewaschen.

Bestimmung der Radioaktivität des Cholesterins:

Nach absoluter Trocknung der Filterplättchen erfolgte die quantitative Bestimmung des neugebildeten C¹⁴ markierten Cholesterins durch Messung der Radioaktivität der Plättchenbeschichtung. Die Aktivität wurde im Methandurchflußzähler⁺⁺⁺ durch Messung der Impulse pro Minute bestimmt. Um zu große Fehler zu vermeiden, wurde jedes Plättchen etwa 10 mal gemessen und daraus der Mittelwert errechnet.

Als Bezugswert dienten 1 - 2 Ansätze ohne Testsubstanz, die der Synthesefähigkeit des verwendeten Enzymsystems entsprachen. Die Impulszahlen dieser Plättchen setzten wir gleich 100 %. Die Impulszahlen der Plättchen aus Ansätzen mit Testsubstanz derselben Versuchsreihe wurden prozentual auf diesen Wert bezogen. So

+ Filtriervorrichtung für radiochemische Arbeiten der Firma Schott und Gen., Mainz

++ Filtrierplättchen "Selekt" der Firma Schleicher und Schüll Nr. 566, Durchmesser 2,8 cm

+++ Methandurchflußzähler FH 51 der Firma Friesecke und Höpfner, Erlangen-Bruck. Zählrohr FH 512, Spannung 3 700 Volt, Diskriminatorstellung 10

wurde es möglich, trotz sehr unterschiedlicher Aktivität der Bezugswerte der einzelnen Versuchsreihen, diese miteinander zu vergleichen.

Die oft großen Schwankungen müssen wohl zum Teil durch die unterschiedliche Enzymaktivität oder Enzymmenge in den Ansätzen bedingt sein.

Bei der Messung auftretende Fehler durch Selbstabsorption konnten in unserem Falle unberücksichtigt bleiben, da die Schichtdicke des neugebildeten Cholesterins sehr dünn war. (Die Menge betrug im Durchschnitt 2 mg.)

Reagentien:

Na-Acetat (Carboxyl C ¹⁴):	Harwell, Radiochemical Center, England.
Biotin:	Deutsche Hoffmann - La Roche AG Grenzach
Avidin:	Serva Entwicklungslabor, Heidelberg
Alle anderen Reagentien	sind p. a. Präparate der Firma Merck, Darmstadt.

Ergebnisse

Die Zahlen in den Tabellen sind Impulse pro Minute und geben die Menge des neu-gebildeten Cholesterins an. Der Versuchswert ohne Testsubstanz dient als Bezugs-wert und ist 100 %. (Er wird im Folgenden sup = supernatand fluid genannt). Die eingeklammerten Zahlen geben die Menge an synthetisiertem Cholesterin in % an, bezogen auf den sup-Wert.

Tabelle 1

Der Einfluß von 50 mg Eialbumin auf die Cholesterinsynthese.

Vers. Nr.	sup	50 mg Eialbumin
1205	775 (100 %)	719 (92,8 %)
1211	1054 (100 %)	1000 (95,0 %)
1217	962 (100 %)	806 (83,5 %)
1220	1018 (100 %)	971 (95,5 %)
1230	1097 (100 %)	811 (73,9 %)
1215	1131 (100 %)	1164 (102,8 %)
1216	1052 (100 %)	995 (94,5 %)
Mittelwert:	100 %	93 %

Im Gegensatz zu früheren Arbeiten hat in unseren Versuchen Eialbumin keinen Einfluß auf die Cholesterinsynthese.

Tabelle 2

Die Abhängigkeit der Cholesterinsynthese von der alpha Globulin bovin-Konzentration.

Vers. Nr.	sup	50 mg	30 mg
1192	926 (100 %)	504 (54,4 %)	516 (55,8 %)
1197	1130 (100 %)	898 (79,6 %)	
1200	1138 (100 %)		826 (72,4 %)
1202	982 (100 %)		662 (67,5 %)
1216	1052 (100 %)	691 (65,6 %)	
1229	1132 (100 %)	756 (67,1 %)	
1234	1120 (100 %)	720 (64,2 %)	
1237	646 (100 %)	461 (71,5 %)	
Mittelwert:	100 %	67,6 %	65,2 %
Mittelwert der Fettsäuresynthese:	100 %	71 %	

Die Cholesterinsynthese wird durch 50 mg alpha Globulin bovin um etwa ein Drittel gehemmt. Ansätze mit 30 mg erzielen denselben Effekt. Etwa derselbe Hemmeffekt wurde bei Parallel-Versuchen zur Hemmung der Fettsäuresynthese erzielt.

Tabelle 3

Die Einwirkung von Mischserum gesunder Menschen auf die Cholesterinsynthese. 5 ml Serum, im Vakuum auf 0,4 ml eingeeengt. Da im Serum die stark hemmenden Salze enthalten sind, wurde es in einem verschlossenen Collodiumschlauch gegen 250 ml stehendes aqua dest. 48 Stunden dialysiert. Die Flüssigkeit im Inneren des Schlauches (I), weitgehend frei von anorganischen Salzen, wurde als Testsubstanz eingesetzt.

Vers. Nr.	sup	Ser.	Ser. I
1199	804 (100 %)	223 (27,8 %)	475 (59,2 %)
1201	1136 (100 %)	272 (24,2 %)	718 (63,1 %)
1203	904 (100 %)	214 (23,7 %)	538 (59,6 %)
1207	758 (100 %)	191 (25,3 %)	492 (65,1 %)
1208	1116 (100 %)	270 (24,3 %)	701 (63,2 %)
1210	1009 (100 %)	302 (30,8 %)	643 (63,9 %)
Mittelwert:	100 %	26,0 %	62,4 %
Mittelwert der Fettsäuresynthese:	100 %	23,5 %	66,5 %

Wie aus der Tabelle ersichtlich, hemmt das Mischserum so stark, daß nur noch eine Ausbeute von 26 % Cholesterin resultierte. Das dialysierte Serum konnte die Synthese nicht mehr in diesem Maße beeinflussen. Es ergab sich eine Syntheserate von 62 %. Auch hier ergaben sich fast dieselben Werte wie bei der Fettsäuresynthese.

Tabelle 4

Die Einwirkung verschiedener Avidinkonzentrationen auf die Cholesterinsynthese:

Vers. Nr.	sup	250	150	100 gamma Av.
1198	838 (100 %)	238 (28,5 %)		
1199	804 (100 %)			319 (39,7 %)
1200	1150 (100 %)			499 (43,6 %)
1201	1136 (100 %)			426 (37,8 %)
1202	982 (100 %)	296 (29,8 %)		
1203	904 (100 %)	182 (20,2 %)		
1212	1552 (100 %)			695 (44,9 %)
1213	800 (100 %)			375 (46,9 %)
1214	502 (100 %)			175 (35,1 %)
1221	650 (100 %)		276 (42,2 %)	
1222	835 (100 %)		401 (48,2 %)	
1223	750 (100 %)	139 (18,6 %)		
1226	531 (100 %)		168 (31,6 %)	
1227	975 (100 %)		344 (35,3 %)	
1234	1120 (100 %)		374 (33,4 %)	
1237	646 (100 %)	202 (31,2 %)		
Mittelwert:	100 %	29,4 %	38,1 %	41,5 %
Mittelwert der Fettsäuresynthese:	100 %	27,8 %		57,8 %

Die Tabelle demonstriert die eindrucksvolle Hemmung der Cholesterinsynthese durch das Avidin. Die Synthesehemmung ist direkt abhängig von der Avidinkonzentration.

Tabelle 5

Die Abhängigkeit der Cholesterinsynthese von verschiedenen Biotinkonzentrationen:

Vers. Nr.	sup	1	5	10 gamma Biot.
1198	838 (100 %)	817 (97,9 %)		
1202	982 (100 %)	1053 (107,5 %)		
1203	904 (100 %)	980 (108,2 %)		
1206	834 (100 %)	775 (92,4 %)		
1210	1009 (100 %)	947 (94,0 %)		
1212	1552 (100 %)		1850 (118 %)	1450 (93,4 %)
1213	800 (100 %)		1034 (129 %)	772 (96,6 %)
1214	502 (100 %)		461 (91,8 %)	562 (112 %)
1215	1131 (100 %)			1050 (93,0 %)
1216	1052 (100 %)			1121 (107 %)
1217	962 (100 %)		935 (97,0 %)	939 (97,6 %)
1218	881 (100 %)			906 (102,5 %)
1219	1076 (100 %)			1131 (105,2 %)
1220	1018 (100 %)		956 (94,1 %)	1150 (113 %)
1221	650 (100 %)			594 (91,5 %)
1222	835 (100 %)			705 (84,5 %)
1223	750 (100 %)	702 (93,8 %)	703 (93,9 %)	
1224	776 (100 %)			772 (99,5 %)
1225	816 (100 %)	890 (109,5 %)	764 (93,8 %)	1116 (136 %)
1226	531 (100 %)			488 (91,9 %)
1227	975 (100 %)			908 (92,8 %)
1229	1132 (100 %)			1171 (103,5 %)
1230	1100 (100 %)			1218 (110,3 %)
1231	900 (100 %)			892 (99,5 %)
1232	1062 (100 %)		955 (89,9 %)	
1236	623 (100 %)			601 (91,6 %)
1237	646 (100 %)			625 (97,0 %)
Mittelwert:	100 %	100,3 %	101,3 %	101,0 %

Mittelwert der

Fettsäuresynthese:	100 %	98,7 %	89,2 %	100 %
--------------------	-------	--------	--------	-------

Die Tabelle bringt zum Ausdruck, daß steigende Biotinkonzentrationen überhaupt keinen Einfluß auf die Cholesterinsynthese haben.

Tabelle 6

Der Einfluß von Biotinkonzentrationen auf die von Avidin gehemmte Cholesterinsynthese:

Vers. Nr.	Sup	250 AV	250 AV + 1 gamma Biotin
1198	838 (100 %)	238 (28,5 %)	753 (90,2 %)
1202	982 (100 %)	296 (29,8 %)	921 (93,7 %)
1203	904 (100 %)	182 (20,2 %)	1014 (111 %)
1223	750 (100 %)	139 (18,6 %)	
1237	646 (100 %)	202 (31,2 %)	
Mittelwert:	100 %	29,4 %	98,3 %

Vers. Nr.	Sup	150 AV	150 AV + 10 gamma Biotin
1221	650 (100 %)	276 (42,2 %)	571 (87,8 %)
1222	835 (100 %)	401 (48,2 %)	822 (98,6 %)
1226	531 (100 %)	168 (31,6 %)	553 (104,2 %)
1227	975 (100 %)	344 (35,3 %)	
1234	1120 (100 %)	374 (33,4 %)	
Mittelwert:	100 %	38,1 %	96,9 %

Vers. Nr.	Sup	100 AV	100 AV + 5 gamma Biotin
1199	804 (100 %)	319 (39,7 %)	
1200	1150 (100 %)	499 (43,6 %)	
1201	1136 (100 %)	426 (37,8 %)	
1212	1552 (100 %)	695 (44,9 %)	
1213	800 (100 %)	375 (46,9 %)	830 (104 %)
1214	502 (100 %)	175 (35,1 %)	478 (95,2 %)
1232	1062 (100 %)		990 (92,9 %)
Mittelwert:	100 %	41,5 %	97,4 %

Die Werte zeigen die Aufhebung der mit Avidin gehemmten Cholesterinsynthese durch Zusatz verschiedener Biotinkonzentrationen. Der Verlust der Hemmung ist nicht von der Biotinkonzentration abhängig.

Tabelle 7

Die Beeinflussung der Cholesterinsynthese von Avidin in 0,3 ml Eiklar ohne und mit Zusatz von 10 Gamma Biotin:

Vers. Nr.	sup	0,3 ml Eiklar	0,3 Eiklar + 10 Biotin
1214	502 (100 %)	252 (49,7 %)	447 (89,2 %)
1216	1052 (100 %)	560 (53,1 %)	1039 (98,5 %)
1219	1076 (100 %)	445 (41,5 %)	1101 (102,5 %)
1221	650 (100 %)	263 (40,5 %)	657 (101,0 %)
1222	835 (100 %)	436 (52,1 %)	798 (95,6 %)
Mittelwert:	100 %	47,4 %	97,4 %
Mittelwert der Fettsäuresynthese:	100 %	47,8 %	81,7 %

Durch Zusatz von 10 Gamma Biotin wird die deutliche Hemmwirkung des Eiklars aufgehoben.

Diskussion

In früheren Arbeiten wurde durch Eialbumin eine zum Teil beträchtliche Hemmung der Cholesterinsynthese erreicht. Unsere Versuche konnten diese früheren Ergebnisse nicht bestätigen. Wir konnten überhaupt keinen Einfluß von Eialbumin auf die Synthese beobachten. Da früher mit humanen und bovinen Albuminen auch keine nennenswerte Hemmung erreicht werden konnte, wurde darauf hingewiesen, daß Verunreinigungen im Eialbumin die Synthese beeinflussen könnten. Die Wirkungslosigkeit des Eialbumins in unseren Versuchen ist vielleicht in einer inzwischen stärker gereinigten Substanz zu suchen.

Wie schon oben gesagt, geht bei verschiedenen Krankheiten eine Alpha- und Beta-Globulinerhöhung mit einer Senkung der Serumlipide einher. Da wir in unseren Versuchen durch Zusatz von alpha-Globulin eine Senkung der Cholesterinsynthese erzielten, liegt der Schluß nahe, daß auch im menschlichen Körper die Senkung des Cholesterinspiegels durch eine Synthesehemmung erreicht wird.

Mischserum hemmt fast um 75 %. Das ist insofern nicht erstaunlich, als wir in Vorversuchen sehen konnten, daß anorganische Salze, die auch im Serum enthalten sind, die Synthese maximal hemmen. Durch dialysiertes und damit weitgehend salzfreies Mischserum wird fast dieselbe Hemmung der Cholesterinsynthese erreicht, wie bei den alpha-Globulinen.

Dieses Ergebnis verleitet zu dem Schluß, daß es vielleicht wieder die Globuline im Serum sind, die die Synthesehemmung bewirken.

Der Mechanismus der Synthesehemmung konnte anhand unserer Versuche nicht erklärt werden. Da die Fettsäuresynthese fast in demselben Maße gehemmt wurde, ist eine Blockierung auf einer gemeinsamen Stufe wahrscheinlich.

Eine gemeinsame Vorstufe ist das Acet-Acetyl-CoA. (8)

Unter den alpha-Globulinen finden sich Glyko- und Lipoproteide. Letztere enthalten Cholesterin (zum größten Teil verestert, aber auch freies) und Phospholipide. Neben dem mit den alpha-Globulinen zugeführten Cholesterin, das die endogene Synthese zwischen HMG-CoA und Mevalonsäure hemmt, (s.o. Sieperstein) müs-

sen auch andere Faktoren eingreifen, denn die gehemmte Fettsäuresynthese läuft auf dieser Stufe nicht mehr parallel mit der Cholesterinsynthese.

Wie aus früheren Arbeiten ersichtlich, hemmen die ungesättigten Fettsäuren sowohl die Cholesterin- als auch die Fettsäuresynthese. Der Hemm-Effekt der Globuline wäre also auch durch das Vorhandensein von ungesättigten Fettsäuren in den Lipoproteiden zu erklären.

Avigan (47) konnte nachweisen, daß die Acet-Acetat-Neubildung durch Fettsäuren stark gehemmt wurde, während die Neubildung des Acetyl-CoA nicht beeinflusst wurde.

Der Block könnte durch Inaktivierung eines Fermentsystems zustande gekommen sein, wobei eine Komplexbildung mit dem Fermentsystem oder eines Teils davon diskutiert wird.

Bei der Hemmung der Cholesterinsynthese durch die alpha-Globuline wären natürlich noch andere Angriffspunkte möglich, da die Proteine sehr komplexer Natur sind und ihre Abbauprodukte sehr rege am Gesamtstoffwechsel teilnehmen.

Der Einbau von C_2 -Bruchstücken in die Cholesterinsynthese und damit eine verminderte Ausbeute an markiertem Cholesterin rückt in den Bereich der Möglichkeit. In unseren Versuchen war aber immer C^{14} Acetat im Überschuß vorhanden, sodaß die beim Proteinabbau entstehenden Bruchstücke hier nicht als Baustofflieferant zum Zuge kommen dürften.

Weit möglicher wäre die Inaktivierung eines Fermentsystems an anderer Stelle oder die Bindung eines Zwischenproduktes der Synthese zu einem nicht mehr reagierenden Komplex. Das sind Vermutungen, die noch einer Aufklärung bedürfen.

In Übereinstimmung mit Arbeiten von Wakil (48, 49) konnten wir eine Synthese-hemmung bis zu 70 % mit Avidin erreichen. Auch in unseren Versuchen bestand eine direkte Abhängigkeit der Hemmung von der Avidinkonzentration.

Wenn man die parallel laufenden Versuche zur Hemmung der Fettsäuresynthese betrachtet, die zu ganz ähnlichen Ergebnissen führten, muß man einen Angriffspunkt auf einer gemeinsamen Vorstufe annehmen.

Eine Erklärung gibt Brodie, der annimmt, daß die Synthese von HMG-CoA aus Acet-Acetyl-CoA über Malonyl-CoA läuft (51). Das Malonyl-CoA entsteht aber durch Carboxylierung des Acetyl-CoA unter Verbrauch von ATP. Das Enzym Beta-methyl-crotonyl-CoA Carboxylase mit der prosthetischen Gruppe Biotin katalysiert dabei den Vorgang (44).

Die Hemmung durch Avidin läßt sich mit der festen Bindung des Biotin an das Avidin erklären. Es entsteht der undissoziierbare Avidin-Biotin-Komplex. Da Biotin als entscheidender Faktor bei der Carboxylierungsreaktion nicht mehr im ursprünglichen Maße zur Verfügung steht, muß eine Hemmung der Malonylsynthese und damit der Fettsäure- und Cholesterinsynthese eintreten. Mit steigenden Avidinkonzentrationen steht immer weniger biotinhaltiges Enzym zur Verfügung.

In unseren Versuchen fügten wir zu den stark hemmenden Avidinkonzentrationen Biotin hinzu. Bei allen Versuchen wurde die Hemmung aufgehoben: Das Biotin stand für die Synthese wieder zur Verfügung und die Cholesterin- und Fettsäuresynthese konnte ungestört verlaufen. Damit konnten wir wieder Ergebnisse von Wakil und Gibson zur Hemmung der Fettsäuresynthese durch Avidin und ihre Aufhebung durch Biotin bestätigen.

Die Cholesterinsynthese ist mit vielen enzymatischen Abläufen verbunden. Als besonders labil wurde die Aktivität der beta-hydroxy-beta-methyl-glutaryl-CoA-Reduktase beschrieben (51, 52). Ob Avidin dieses Enzymsystem beeinflusst, kann anhand unserer Versuche nicht gesagt werden.

Es ist unbekannt, ob Avidin neben der Komplexbildung mit Biotin noch andere Funktionen innehat. Da man aber weiß, daß es von stark basischem Charakter ist, muß angenommen werden, daß es auch an verschiedenen anderen Reaktionen teilnimmt.

Da Avidin aus rohem Hühnereiweiß isoliert wurde, setzten wir Eiklar als Testsubstanz ein. Wir erzielten eine Hemmung der Cholesterinsynthese von über 50 %. Daß hier eine Biotin-Inaktivierung zum Zuge kam, konnten wir durch Zusatz von Biotin belegen. Bei Anwesenheit von 10 gamma Biotin wurde die Hemmung aufgehoben.

In unseren Versuchen wurde durch verschiedene Biotinkonzentrationen kein Ein-

fluß auf die Cholesterinsynthese ermittelt. Wir konnten auch hier frühere Versuchsergebnisse bestätigen.

Eine Erklärung, warum es bei Zugabe von Biotin nicht zu einer erwarteten Synthesesteigerung kommt, ist zunächst in einem fehlenden Mehrangebot an CoA zu suchen.

Wakil konnte nämlich zeigen, daß durch zusätzliche Gabe von CoA und dadurch angeregte Bildung von Acetyl-CoA aus Pyruvat bei Biotinüberschuß eine deutliche Steigerung der Syntheserate ermöglicht wurde. Es waren weitere Bausteine vorhanden. Um eine verstärkte Synthese zu erzielen, müßte außerdem auch mehr Energie in Form von ATP bereitgestellt werden. Wie schon oben gesagt, vollzieht sich die Synthese von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA nur unter Verbrauch von ATP. Das ATP im Ansatz reicht aber für die mehrangebotene Menge Biotin scheinbar nicht aus, um den Carboxylierungsvorgang zu unterstützen. Diese These wurde in früheren Versuchen erhärtet: Nach Zusatz von ATP wurde eine Syntheseförderung erreicht.

Es sei noch darauf hingewiesen, daß für unsere Versuche natürliche Homogenate zur Verfügung standen, in denen unbekannte Faktoren zur Geltung kamen. Exakte Aussagen könnten nur gemacht werden, wenn genau zusammengestellte Enzymsysteme für die Synthese bereitstehen würden.

Zusammenfassung

Mit einem löslichen Enzymsystem, das aus Taubenlebern gewonnen wurde, konnte der Einfluß von Eialbumin, alpha-Globulin-bovin und Mischserum auf die Cholesterinsynthese ermittelt werden. Zur Untersuchung kamen ferner verschiedene Avidin- und Biotinkonzentrationen sowie der Avidin-Biotin-Komplex.

Es lassen sich folgende Ergebnisse formulieren:

1. Eialbumin konnte keinen Einfluß auf die Cholesterinsynthese ausüben.
2. Alpha-Globulin hemmte die Cholesterinsynthese um etwa 33 %. 50 und 30 mg Testsubstanz hatten denselben Hemm-Effekt.
3. Mischserum gesunder Menschen hemmte die Cholesterinsynthese um 74 %.
4. Dialysiertes und damit weitgehend salzfreies Serum hemmte nur noch um 34 %.
5. Avidin reduziert die Cholesterinsynthese. Die Hemmung ist abhängig von der Avidinkonzentration. Bei 250 Gamma Avidin wird eine Synthesehemmung von 70 % erreicht.
6. Die starke Hemmwirkung des Avidins wird durch Zusatz von Biotin aufgehoben.
7. Biotin hat ohne Zusatz von ATP und CoA keinen Einfluß auf die Cholesterinsynthese.
8. Die über 50 %ige Hemmwirkung von 0,3 ml Eiklar, das Avidin enthält, wird durch 10 µl Biotin aufgehoben.

29. Glatzel, H. D. Med. Wschr. 85: 1296 (1960)
D. Med. Wschr. 86: 2493 (1961)
30. Simon, K. H. Naturw. Rundschau 16: 57 (1963)
31. Keys, A. D. Med. Wschr. 86: 2490 (1961)
32. Wenger, R. Dt. Med. J. 12: 156 (1961)
33. Knüchel, F. Med. Welt 18: 1848 (1967)
34. Schön, H. Med. Klinik 55: 2195 (1960)
35. Atheroskler. Res. 3: 5/6 Sept./Dez. (1963)
36. Hellmann, L. Ann. int. Med. 59: 477 (1963)
37. Schettler Klinik der Gegenwart
38. v. Brand, V., Seitz, W. Med. Klinik 55: 723 (1960)
39. v. Brand, V., Seitz, W. Klin. Wschr. 36: 87 (1958)
40. Sieperstein, M. D. Amer. J. clin. nutr. 8: 647 (1960)
41. Melville, D. B. Amer. J. med. sci. 204: 856 (1942)
42. Oppel, T. W. J. biol. Chem. 146: 487 (1942)
43. Spector, W. Handbook of Biolog. Data, Philadelphia 1956
44. Lynen, F. und Mitarb. Sitzungsbericht der math. naturw. Klasse der
Bayer. Akad. d. Wissensch. 1959
45. Brandy und Gurin J. biol. chem. 199: 421 (1952)
46. v. Brand, V., Helmreich, E.
Biochem. Z. 328: 146 (1956)
47. Avigan, J. Biochem. J. 60: 329 (1955)
48. Wakil, S. J. Biochem. biophys. Acta 29: 225 (1958)
49. Wakil, S. J. Biochem. biophys. Acta 41: 122 (1960)
50. Wieland, O., Eger-Neufeld
Biochem. Z. 337: 349 (1963)
51. Buchner, N., Lynen, F. Biochem. biophys. Acta 40: 491 (1960)
52. Gries, F., Wieland, O. Biochem. biophys. Acta 56: 615 (1962)

Die vorliegende Arbeit wurde im Isotopenlabor der Universitäts-Poliklinik in München unter der Leitung von Professor Dr. W. Seitz und unter der Regie von Frau Dr. phil. et med. Vera Nagengast-von Brand durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. W. Seitz für das Überlassen des Themas.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. phil. et med. Vera Nagengast-von Brand bedanken, die mir immer helfend und beratend zur Seite stand.

Mein herzlicher Dank gebührt auch der technischen Assistentin Fräulein Heide Wilde, für ihre freundliche und tatkräftige Mithilfe.

Lebenslauf

Am 26. 2. 1937 wurde ich, Henrik v. Dehn als Sohn des Gutsbesitzers Alexander v. Dehn und seiner Gemahlin Lore, geb. Koch in Reval/Estland geboren.

Besuch der Volksschule in Rottenbuch/Obb.

Beginn der höheren Schule in Weilheim. Durch Umzug nach München besuchte ich die Gisela ORS in München, wo ich 1959 die Reifeprüfung ablegte.

Studium in München an der Ludwig-Maximilians-Universität. Die letzten 3 Semester hörte ich an der Saarländischen Universität zu Homburg, wo ich 1965 das Staatsexamen bestand.

